

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:

Ji-Won YOON et al.

Application No.: Unassigned

Group Art Unit: Unassigned

Filed: November 29, 2001

Examiner: Unassigned

For: RECOMBINANT VACCINIA INCORPORATED WITH GENE CODING GLUTAMIC ACID
DECARBOXYLASE AND VACCINE FOR PREVENTING TYPE 1 DIABETES MELLITUS
COMPRISING THE SAME



#2
ny
1-9-02

**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIOR FOREIGN
APPLICATION IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF 37 C.F.R. § 1.55**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In accordance with the provisions of 37 C.F.R. § 1.55, the applicant(s) submit(s)
herewith a certified copy of the following foreign application:

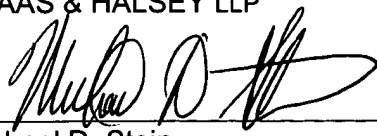
Korean Patent Application No. 2000-85240, filed December 29, 2000.

It is respectfully requested that the applicant(s) be given the benefit of the foreign filing
date(s) as evidenced by the certified papers attached hereto, in accordance with the
requirements of 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

STAAS & HALSEY LLP

Date: 11/29/01

By: 
Michael D. Stein
Registration No. 37,240

700 11th Street, N.W., Ste. 500
Washington, D.C. 20001
(202) 434-1500

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

Jc821 U.S. PTO

09/995829



11/29/01

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 85420 호
Application Number

출원년월일 : 2000년 12월 29일
Date of Application

출원인 : 주)녹십자
Applicant(s)



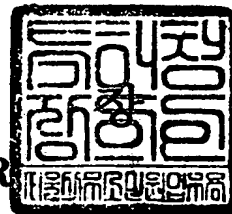
2001 년 04 월 17 일

특

허

청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000. 12. 29
【발명의 명칭】	글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백신니아 바이러스 및 이를 포함하는 제 1형 당뇨병 예방 백신
【발명의 영문명칭】	A RECOMBINANT VACCINIA VIRUS INCORPORATED WITH A GENE CODING GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE AND A VACCINE FOR PREVENTING TYPE 1 DIABETES MELLITUS COMPRISING THE SAM
【출원인】	
【명칭】	주식회사 녹십자
【출원인코드】	1-1998-000506-8
【대리인】	
【성명】	신용길
【대리인코드】	9-1998-000266-2
【대리인】	
【성명】	정진수
【대리인코드】	9-1999-000369-4
【발명자】	
【성명의 국문표기】	윤지원
【성명의 영문표기】	Y00N, Ji-Won
【주소】	206 Edgeview Dr.NW, Calgary, Alberta, Canada T3A 4W9
【국적】	US
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	ATCC (American Type Culture Collection)
【수탁번호】	VR-1354
【수탁일자】	2000.08.17
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	10
【서열목록의 전자문서】	미첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 길 (인) 대리인 정진수 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
---------	----	---	--------	---

【가산출원료】	11	면	11,000	원
---------	----	---	--------	---

【우선권주장료】	0	건	0	원
----------	---	---	---	---

【심사청구료】	0	항	0	원
---------	---	---	---	---

【합계】	40,000	원		
------	--------	---	--	--

【요약서】

【요약】

본 발명은 글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 제 1형 당뇨병 예방백신에 관한 것으로, 더욱 상세하게는; 췌장 β 세포에 대한 주요 자가면역항원 단백질로 인식되는 글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백시니아 바이러스를 제조하고, 이로부터 발현된 글루타민산 데카르복실라제가 자가반응성 T 세포(autoactive T cell)를 강하게 억제하여 자가면역반응을 예방하는 내성(immunological tolerance)을 유도함으로써 효과적으로 제 1형 당뇨병의 발병을 예방 또는 지연시킬 수 있는 글루타민산 데카르복실라제-코딩 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스 및 이를 함유하는 제 1형 당뇨병 예방백신에 관한 것이다. 이러한 본 발명에 따르면, GAD-발현 백시니아 바이러스는 보다 경제적인 방법으로 GAD를 대량생산할 수 있을 뿐 아니라, 강력한 면역 반응을 유도하고, 심각한 부작용이 없이 사람에게 성공적으로 사용할 수 있고, 따라서, GAD-발현 백시니아 바이러스를 포함하는 본 발명에 따른 당뇨병 예방백신은 당뇨병 진행에 대하여 높은 위험성을 갖는 개체에 있어서 제 1형 당뇨병을 예방하기 위한 백신으로서 매우 유용하다.

【대표도】

도 2

【명세서】

【발명의 명칭】

글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백신니아 바이러스 및 이것을 포함하는 제 1형 당뇨병 예방 백신{A RECOMBINANT VACCINIA VIRUS INCORPORATED WITH A GENE CODING GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE AND A VACCINE FOR PREVENTING TYPE 1 DIABETES MELLITUS COMPRISING THE SAME}

【도면의 간단한 설명】

도 1-a는 GAD 발현 재조합 백신니아 바이러스의 제조과정을 나타낸 것이다.

도 1-b는 GAD65 발현 백신니아 바이러스 벡터의 개략적인 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 재조합 백신니아 바이러스에서 GAD65의 발현여부를 확인하기 위한 면역 조직화학적 염색을 나타낸 것이다.

도 3은 RVV-GAD65, RVV-MJ601을 접종하거나 또는 비접종한 각 주령의 마우스를 대상으로 당뇨병의 발병정도를 40주령까지 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 RVV-MJ601, RVV-GAD65 또는 비접종한 마우스를 대상으로 인슐린염(insulinitis)의 발병정도를 나타낸 것이다.

도 5a는 RVV-GAD65 접종 마우스(25주령) 유래의 섬세포(islets)에 대한 광학현미경 사진이다.

도 5b는 RVV-MJ601 접종 마우스(25주령) 유래의 섬세포에 대한 광학현미경 사진이다.

도 5c는 비접종 마우스(25주령) 유래의 섬세포에 대한 광학현미경 사진이다.

도 5d는 RVV-GAD65 접종 마우스(25주령) 유래의 타액선에 대한 광학현미경 사진이다.

도 5e는 RVV-MJ601 접종 마우스(25주령) 유래의 타액선에 대한 광학현미경 사진이다.

도 5f는 비접종 마우스(25주령) 유래의 타액선에 대한 광학현미경 사진이다.

도 6은 RVV-GAD65, RVV-MJ601을 접종하거나 또는 비접종한 마우스로부터 각각 추출한 비장세포의 증식반응을 나타낸 것이다.

도 7은 RVV-GAD65, RVV-MJ601을 접종하거나 또는 비접종한 마우스로부터 혈액을 각각 채취하여 체액성 면역반응 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 RVV-GAD65, RVV-MJ601을 접종하거나 또는 비접종한 마우스로부터 각각 채취한 비장세포의 GAD 자극에 따른 in vitro에서 INF- γ 의 분비정도를 나타낸 것이다.

도 9는 RVV-GAD65, RVV-MJ601을 접종하거나 또는 비접종한 마우스로부터 각각 채취한 비장세포의 GAD 자극에 따른 in vitro에서 IL-4의 분비정도를 나타낸 것이다.

도 10은 RVV-GAD65, RVV-MJ601을 접종한 마우스 및 급성 당뇨병 비비만성 당뇨병(nonobese diabetic, 이하 'NOD'라 한다.) 마우스로부터 채취한 비장세포를 혼합하여 접종 후, T 임파세포 및 B 임파세포를 제거한 NOD scid(severe combined immunodeficiency disease) 마우스(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에서 당뇨병 발병정도를 8주간 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<17> 본 발명은 글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 제 1형 당뇨병 예방백신에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 췌장 β 세포에 대한 주요 자가면역항원 단백질로 인식되는 글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백시니아 바이러스를 제조하고, 이로부터 발현된 글루타민산 데카르복실라제가 자가반응성 T 세포(autoactive T cell)를 강하게 억제하여 자가면역반응을 예방하는 내성(immunological tolerance)을 유도함으로써 효과적으로 제 1형 당뇨병의 발병을 예방 또는 지연시킬 수 있는 글루타민산 데카르복실라제-코딩 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스 및 이를 함유하는 제 1형 당뇨병 예방백신에 관한 것이다.

<18> 일반적으로, 당뇨병은 인슐린 또는 인슐린의 작용이 부족하여 글루코스의 대사장애가 생기는 질환으로 인슐린 투여효과에 따라 제 1형 당뇨병(Type 1 diabetes mellitus)과 제 2형 당뇨병으로 구분된다. 이 중에서, 제 1형 당뇨병은 인슐린 투여로 증상이 호전되는 것으로 인슐린-의존성 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus; IDDM)이라 하며, 췌장의 β 세포에 대한 자가면역반응으로 생기는 질환이다. 인간이나 비비만성 당뇨 마우스의 경우, 항원-특이적 자가반응성 T 세포의 매개에 의해 β 세포-특이적 자가면역성(β cell-specific autoimmunity)을 나타내어 췌장 β 세포를 파괴함으로써 결과되는 것으로, 주로 인슐린염과 같은 증상을 나타낸다. 이러한 자가면역반응을 유발하는 β 세포 표적 자가항원으로는 사람, 비비만성 당뇨(nonobese diabetic, 이하 'NOD'라 한다.) 마우스 및 바이오브리딩(BioBreeding) 랫트에서 동정된 글루타민산 데카르복

실라제(glutamic acid decarboxylase, 이하 'GAD' 라 한다)가 있으며, 이는 제 1형 당뇨병을 일으키는 강력한 후보물질로 알려져 있다(Tisch, R. et al., Nature 366, 72-75, 1993) 최근, 본 발명자들은 β 세포-특이적 GAD 발현의 억제가 결과적으로 NOD 마우스에서 자가면역 당뇨병을 예방한다는 것을 발견한 바 있으며(J. W. Yoon et al., Science 284, 1183-1187, 1999), 이는 β 세포의 GAD 발현이 제 1형 당뇨병의 유도에 필수적임을 암시한다.

따라서, 상기의 자가면역항원으로 기능하는 GAD 단백질을 이용하여 췌장 β 세포에 대한 T 세포 매개 면역반응을 내성화 시킴으로써 자가면역에 의해 β 세포가 파괴되는 인슐린염 및 제 1형 당뇨병을 예방하거나 지연시키고자 하는 연구가 종래부터 진행되어 왔으며 그러한 예로는 우선, NOD 마우스를 대상으로 정제한 GAD 단백질을 주사하여 면역시킴으로써 제 1형 당뇨병을 예방하는 방법(Elliott, J.F., et al., Diabetes 43, 1494-1499, 1994); 둘째, GAD 발현 식물을 섭취하는 GAD의 경구투여 방법 등이 보고된 바 있다(Ma, S.W., et al., Nature Med. 3, 793-796, 1997).

<20> 그러나, 상기의 첫째 방법은 GAD 단백의 불용성으로 인해 박테리아에서 다량의 GAD 단백질을 생산하기 어려울 뿐만 아니라, 백클로바이러스(baculovirus) 또는 포유동물 세포에서 다량의 GAD 단백질을 얻기 위하여는 많은 비용과 노력이 소요되는 문제점이 있다. 또한, 둘째 방법인 GAD 발현 식물을 경구투여하는 방법은 식물 중의 GAD 농도가 한정되어 있어 장기간 섭취해야 하는 문제점이 있어 이에 대한 개선의 필요성이 절실했다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<21> 이에, 본 발명의 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하고자 예의 노력한 결과,

β 세포 자가항원 단백질로 인식되는 GAD를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백신니아 바이러스를 제조하고, 이를 이용하여 효과적으로 자가반응성 T 세포 매개 면역반응을 억제하여 인슐린-의존성 당뇨병이 발병되는 NOD 마우스로 하여금 내성을 유도하게 함으로써 제 1형 당뇨병의 발병을 예방하거나 지연시킬 수 있음을 확인하고, 그 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

<22> 따라서, 본 발명은 GAD를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 바이러스를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<23> 또한, 본 발명은 상기 GAD를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백신니아 바이러스를 포함하는 제 1형 당뇨병 예방 백신을 제공하는 것을 포함한다.

【발명의 구성 및 작용】

<24> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

<25> 우선, 본 발명은 글루타민산 데카르복실라제(GAD)를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 바이러스에 관한 것으로, 바람직하기로는 재조합 백신니아 바이러스를 포함한다. 여기서, 사용되는 바이러스는 백신니아 바이러스(Vaccinia virus)로서, 이는 천연두 (small pox)에 대한 생백신으로 사용된 바 있으며(Fenner, F., Res. Virol. 140, 465-466, 1989) 특히 재조합 백신니아 바이러스는 표적 단백질에 대한 체액성 및 세포-매개성 면역반응을 유도할 뿐만 아니라(Hany, M., et al., Eur. J. Immunol. 19, 417-424, 1989), 유도된 면역 반응은 장기간 지속되는 특성이 있는 것으로 알려져 있다(Moss, B., Science 252, 1662-1667, 1991). 또한, 안전성이 매우 우수하여, 사람 면역결핍 바이러스 타입1(HIV-1) 엔벨로프(envelop) 유전자를 발현하는 백신니아 바이러스를 건강인에게

피하주사한 제 1상 임상시험 결과 피시험자에서 어떠한 부작용도 보이지 않았다는 연구 보고가 있었다(Cooney, E.L., et al., Lancet 337, 569-572, 1991). 이러한 점들을 고려할 때, GAD 발현 재조합 바이러스로는 백시니아 바이러스가 가장 적합하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

<26> 또한, 본 발명은 상기와 같은 GAD를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하고, 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 함유하는 제 1형 당뇨병 예방 백신을 포함한다. 이때, 상기 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 백신 분야에서 통상적으로 첨가되는 첨가제를 포함할 수 있으며, 예를 들면, 사람 혈청 알부민, 유당, 백당, 포르말린, 젤라틴, 폴리소르베이트 80, 아미노초산, 시스테인, 에틸렌 디아민테트라초산 또는 글루타민산 나트륨 등의 안정제와 치메로살, 황산카나마이신, 에라스로파아신, 소스트랩토마이신, 페놀 또는 네오마이신 등의 보존제를 포함 할 수 있다.

<27> 또한, 본 발명에 따른 제 1형 당뇨병 예방 백신은 정맥주사, 피하주사, 복강주사 등을 포함한 다양한 형태의 비경구형 제형으로 투여될 수 있으며, 그 투여량은 투여되는 개체의 성별, 나이, 질병의 유무 등 다양한 인자에 의해 변화될 수 있지만, 통상 1×10^3 PFU $\sim 1 \times 10^{11}$ PFU, 바람직하게는 1×10^6 PFU $\sim 1 \times 10^8$ PFU의 용량으로 투여할 수 있다.

<28> 본 발명에 사용하는 글루타민산 데카르복실라제는 GAD65를 사용하는데, 이에 대한 쥐 및 사람의 아미노산 및 염기서열은 이미 알려져 있다(Biochemica et Biophysica Acta, 1216(1993) 157-160, WO 92/05446). 또한 본 발명의 목적을 달성하기 위하여는 일부 변형된 GAD65를 사용할 수 있는 데, Essen 등은 변형되지 않은 GAD65가 pyridoxal-5'-phosphate(PLP)의 존재 하에서 신경전달물질인 gamma-aminobutyric acid(GABA)의 합성에 관여함으로써 발생할 수 있는 부작용을 방지하기 위하여 중양의 세

개의 염기서열을 변형한 GAD65를 개발하였다(WO 95/27051, WO 97/12034). 이렇게 면역성은 유지하면서 효소활성을 제거한 변형된 GAD65 및 단편을 본 발명의 글루타민산 데카르복실라제의 정의에 모두 포함시킬 수 있을 것이다.

<29> 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다. 하기 실시예에서 통계분석은 스튜던트 t-테스트를 사용하여 수행하였다.

<30> 실시예 1 : 재조합 백시니아 바이러스의 제작

<31> (1) GAD65-코딩 마우스 cDNA의 준비

<32> 마우스 GAD65 코딩 cDNA가 삽입되어 있는 pBlue Script SK를 Dr. Daniel Kaufman

(Univ. of California, Los Angeles)로부터 구입하여 제한효소 XbaI 과 HindIII로 절단하여 GAD65-코딩 마우스 cDNA를 준비하였다.

<33> (2) 재조합백터 pMJ-GAD65의 제작

<34> 상기에서 준비한 GAD65-코딩 마우스 cDNA를 강력한 후기 합성 프로모터를 갖는 백시니아 바이러스 백터 pMJ601(Dr. Ben Moss, NIH)의 멀티플 클로닝 사이트 중 NheI 및 HindIII 제한효소 사이트에 삽입하여 재조합백터 pMJ-GAD65를 제조하였다.

<35> 그 개략적인 구조를 다음 도 1-b에 나타내었다. 이때, TK_L은 왼쪽 위치의 티미딘 카이나제 좌위; TK_R은 오른쪽 위치의 티미딘 카이나제 좌위; LacZ는 β -갈락토시다제(galactosidase)를 코딩하는 좌위; GAD65는 마우스의 GAD65 cDNA를 나타낸다.

<36> (3) RVV-GAD65 및 RVV-pMJ601의 제작

<37> 우선, 10% FCS(fetal calf serum) 및 50 μ g/ml의 겐타마이신을 함유한 DMEM에서 배

양시킨 CV-1 세포(ATCC No. CCL-70)에 야생형 백시니아 바이러스(ATCC No. VR 1354) 0.05 PFU/cell 1ml로 미리 감염시켜 숙주세포를 준비하였다. 숙주세포는 CO₂ 인큐베이터에서 15분 간격으로 2시간 동안 진탕(rocking)하면서 배양하였다. 그런 다음, 상기에 표시된 클로닝시킨 재조합 플라스미드(pMJ-GAD65) 20 μ g 또는 pMJ601 20 μ g를 일렉트로포레이션(electroporator, BioRad, USA)를 이용하여 각각 0.4 kv, 25 μ F의 조건하에서 일렉트로포레이션(electroporation) 하여 형질전환 시키고 2일 동안 배양 후 이들을 동결 및 해빙 방법으로 용균시키고 이들 용균물을 스크리닝하는 데 이용하였다.

<38> (4) RVV-GAD65의 스크리닝

<39> 우선, 10% FCS, 50 μ g/ml의 겐타마이신 및 5 μ g의 5-브로모데옥시우리딘(BrdU)을 함유한 DMEM에서 배양시킨 HuTK-143B 세포(ATCC No. CRL8303)를 준비하였고, 이 세포를 6-well 조직배양 플레이트에 5 $\times 10^5$ cells/well 씩 심고 배양하였다. 상기에서 수득한 용균물을 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 0.05% 트립신(Life Technologies, Gaithersburg, MD)으로 처리한 다음, 10⁻¹ 내지 10⁻⁴까지 희석시켰다. 희석된 세포 용균물을 20분 간격으로 rocking하면서 1시간동안 접종하였다. 그리고, 상기 접종이 완료되기 전에, 45 $^{\circ}$ C 워터베이스에서 2% LMP 아가로스(Life technologies)와 5% FBS, 25 μ g/ml의 5-브로모데옥시우리딘(BrdU) 및 5 μ g/ml의 겐타마이신이 보충된 2X MEM 배지(Life technologies)를 데웠다. HuTK-143B 세포로부터 접종바이러스를 제거한 후, 혼합 아가로스를 오버레이(overlay)시키고 상온에서 고형화시켰다. 2일후, 100 μ g/ml의 중성 레드(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 함유한 1ml의 2X MEM과 1ml의 LMP가 혼합된 2ml의 아가로스를 오버레이시킨 다음, 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 그리고 발생된 플라그를 살균된 코튼-플러그(cotton-plugged) 파스퇴르 파이펫을 이용하여 별도로 정제하였고, 플라그

정제를 수회 반복 수행하여 RVV-GAD65를 선별하여 ATCC에 2000년 11월 20일자로 기탁하였다(ATCC No. VR-1354)

<40> 실험예 1: GAD 발현의 확인

<41> 상기 실시예 1로부터 수득한 재조합 백시니아 바이러스로부터 GAD65의 발현을 확인하기 위하여 GAD 특이 IgG1 단일클론항체(ATCC No. HB 184)을 사용하여 RVV-GAD65 감염 세포의 면역조직화학 검사를 수행하였다. 즉, HeLa 세포를 Lab-Tek 슬라이드 플라스크(Nunc, Naperville, IL)에서 배양하고, RVV-GAD65로 감염시켰다. 감염 3일 후, 세포를 세척하고 아세톤으로 고정하였다. 고정된 세포를 단일클론항체와 반응시키고, 양고추냉이 퍼옥시다제-접합 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody)와 함께 배양한 후, DAB 키트(Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA)를 사용하여 시각화하여 GAD 발현 세포를 검출하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<42> 비교 실험예 1:

<43> GAD65로 클로닝시키지 않은 플라스미드 pMJ601만으로 재조합시켜 수득한 재조합 백시니아 바이러스 RVV-MJ601을 사용한 점을 제외하고는 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 면역조직화학 검사를 수행하였다. 그리고, 그 결과를 다음 도 2에 나타내었다.

<44> 이상의 도 2의 결과에 따르면, 왼쪽 패널은 GAD 단백질을 코딩하는 유전자에 의해 클로닝되지 않은 플라스미드만으로 재조합된 백시니아 바이러스, RVV-MJ601에 의해 감염된 HeLa 세포를 나타내고 있는 데 반하여, 오른쪽 패널은 RVV-GAD65에 의해 감염된 HeLa 세포를 나타낸다. 따라서, RVV-GAD65로 감염시킨 HeLa 세포는 GAD 단백을 발현하였으나, GAD의 cDNA가 없는 재조합 백시니아 바이러스(이하, 'RVV-MJ1601'이라 한

다)는 GAD 단백을 발현하지 않았다

<45> 실험예 2: 당뇨병 발병의 억제 효과

<46> 3 주령의 암컷 NOD 마우스(Taconic Co., Germantown, NY)에 RVV-GAD65 5×10^7 PFU를 복강주사하였다. 그리고, 상기 마우스를 특정한 무균조건에서 사육하며, 디아스틱스(Diastix; Miles, ON, Canada)를 사용하여 뇨당(urine glucose)을 측정하여, 당뇨병의 발병을 모니터링하고, 또한, 원타치 베이직 글루코미터(Basic glucometer; Lifescan, Milpitas, CA)를 사용하여 혈당(blood glucose)을 측정하여 확인하였다. 3달 연속 16.7 mM 이상의 혈당치를 나타내는 마우스를 당뇨병의 발병으로 분류했으며, 그 결과를 다음 도 3에 요약하여 나타내었다.

<47> 이때, 당뇨병 발병에 대한 RVV-GAD65 투여량이 미치는 영향을 평가하기 위하여 3주령의 암컷 NOD 마우스에 RVV-GAD65를 1×10^7 , 2.5×10^7 , 또는 5×10^7 PFU로 복강주사하고, 또한 8 내지 9 주령의 암컷 NOD 마우스에 RVV-GAD65를 5×10^7 PFU로 복강주사하여 투여 유효량 및 투여시기를 평가하였다. 그 결과, 바이러스 투여량에 따른 당뇨병 발병의 감소효과는 현저하게 나타났다. 즉, 저단위 투여량(1×10^7 PFU)으로 투여한 RVV-GAD65 접종 NOD 마우스에서는 67%(10/15)의 당뇨병 발병율을 나타내었으며, 중간단위 투여량(2.5×10^7 PFU)으로 접종한 RVV-GAD65 접종 NOD 마우스에서 53%(8/15)의 당뇨병 발병율, 그리고, 고단위 투여량(5×10^7 PFU)으로 투여한 RVV-GAD65 접종 NOD 마우스에서는 7%(2/29)만이 당뇨병이 발병하였다. 또한, RVV-GAD65 접종의 시기는 8~9주령의 늙은 NOD 마우스를 RVV-GAD65(5×10^7 PFU/마우스)를 접종시킨 경우, 비접종 NOD 마우스(75%, 9/12)와 비슷한 당뇨병 발병률인 73%(8/11)를 나타내었다. 따라서, RVV-GAD65의 투여량 및 접종시기는 당뇨병 예방백신의 효과에 있어서 매우 중요한 결정인자이다.

<48> 비교 실험예 2:

<49> RVV-GAD65 대신에 RVV-MJ601을 접종바이러스로 사용한 점을 제외하고는 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 뇨당과 혈당을 측정하여 당뇨병의 발병 여부를 결정하였다.

그리고, 그 결과를 다음 도 3에 나타내었다.

<50> 비교 실험예 3:

<51> 바이러스를 전혀 접종하지 않은 채로 사용한 점을 제외하고는 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 뇨당과 혈당을 측정하여 당뇨병의 발병 여부를 결정하였다. 그리고, 그 결과를 다음 도 3에 나타내었다.

<52> 이상의 결과에 따르면, RVV-GAD65 5×10^7 PFU를 3주령의 암컷 NOD 마우스에 복강주사 하기 위하여하고 당뇨병의 진행을 관찰한 결과, RVV-GAD65를 투여한 NOD 마우스에서는 단지 7%(2/29)만이 당뇨병이 발병되었고, 비교 실험예 2의 RVV-MJ1601을 투여한 NOD 마우스에서는 40주령 때에 85%(11/13)의 당뇨병 진행을 보였다. 또한, 비교 실험예 3의 비접종 NOD 암컷 마우스에서는 동일 주령 때에 89%(8/9)에서 당뇨병이 발병되었다. 이들 결과는 RVV-GAD65에 의한 당뇨의 예방은 GAD 항원 특이성이며, 단순히 백시니아 바이러스 감염 자체의 비특이적 효과가 아님을 나타낸다. 그러나, RVV-MJ601 감염 마우스에서 당뇨병의 발병은 비접종 NOD 마우스에서의 발병에 비해 약간 지연되었다. 당뇨병 발병의 평균 연령은 비접종 마우스 군에서는 21주령인데 반하여 RVV-MJ601 투여 마우스 군에서는 26주령이었다. 이에, 본 발명자들은 상기 RVV-MJ601 바이러스에 감염시킨 후, 상이한 시간(1~4주)에 비장세포(splenocyte)에서 사이토카인 유전자의 발현을 조사한 결과, 비접종 마우스에 비하여 비교 실험예 2의 RVV-MJ601 감염 1주일 후, 인터루킨

(IL)-2, 인터페론(IFN)- γ , IL-4 및 IL-10의 발현이 유의성있게 증가하고, 그 후, 사이토카인 발현이 점차 감소하여 감염 3주후에는 정상 수준에 도달하였다. 이 결과는 RVV-MJ601 투여 NOD 마우스 군에서 당뇨병 발병이 약간 늦은 것은 비특이적, 일과성 면역교란에 기인하는 것임을 시사한다.

<53> 실험예 3: 인슐린염의 억제 효과

<54> 3 주령의 NOD 마우스에 RVV-GAD65를 접종시킨 다음, 25주령에 5마리의 마우스를 치사시키고, 채장을 제거하였다. 그리고, 채장을 10% 포르말린 완충액으로 고정시키고, 파라핀으로 고정시킨 후, 4.5 μ m씩 자르고, 헤마토실린 및 에오신 (hematoxylin and eosin, HE)으로 염색하였다. 그리고, 채장 섬세포(islets)의 조직학적 검사를 수행하였고, 그 손상 정도를 다음과 같이 등급화하여 분류하였으며, 또한, 그 결과를 다음 도 4에 요약하여 나타내었다:

<55> 0 - 정상 섬세포;

<56> 1 - 25% 이하의 섬세포에 단핵 침윤;

<57> 2 - 단핵침윤을 보이는 섬세포가 25% ~ 50%;

<58> 3 - 단핵침윤을 보이는 섬세포가 50%이상;

<59> 4 - 거의 단핵세포가 없는 작고 수축된 섬세포.

<60> 또한, 대표적인 섬세포와 타액선의 광학현미경 사진을 다음 도 5a 및 도 5d에 나타내었다.

<61> 비교 실험예 4:

<62> RVV-MJ601로 접종시킨 3 주령의 NOD 마우스를 사용한 점을 제외하고는 상기 실험예

3과 동일한 방법으로 췌장 섬세포(islets)의 조직학적 검사를 수행하여 그 결과를 도 5에 나타내었으며, 또한 섬세포와 타액선의 광학현미경 사진을 다음 도 5b 및 도 5e에 나타내었다.

<63> 비교 실험예 5:

<64> 3 주령의 비접종 NOD 마우스를 사용한 점을 제외하고는 상기 실험예 3과 동일한 방법으로 췌장 섬세포(islets)의 조직학적 검사를 수행하여 그 결과를 도 5에 나타내었으며, 또한 섬세포와 타액선의 광학현미경 사진을 다음 도 5c 및 도 5f에 나타내었다.

<65> 이상의 도 4 및 도 5a 내지 도 5f의 결과에 따르면, RVV-GAD65로 감염된 NOD 마우스군에서 인슐린염은 RVV-MJ601로 감염된 것에 비하여 유의성있게 감소하였다.

RVV-GAD65 접종 NOD 마우스군에서 조사된 섬세포의 87%는 전혀 손상되지 않았으나, 반면에 RVV-MJ601 투여 NOD 마우스의 섬세포의 83%는 25주령에서 비접종 NOD 마우스군의 섬세포와 유사하게 중간정도부터 심각한 정도까지의 손상을 나타내었다. 실험을 종료한 40주령때에서는 RVV-GAD65 접종 마우스군에서 관찰된 섬세포의 42%가 전혀 손상되지 않았고, 섬세포의 50%가 가벼운 인슐린염을 나타내었고, 단지 8%의 섬세포만이 심각한 인슐린염을 나타냈다.

<66> 또한, NOD 마우스에서 임파구 침윤을 나타내는 타액선을 조사한 결과, 비접종 NOD 마우스의 타액선과 유사하게 25주령의 RVV-GAD65 접종 및 RVV-MJ601 접종 NOD 마우스 양자의 타액선에서도 임파구의 심한 침윤을 나타냈다. 이러한 결과는 RVV-GAD65를 접종하여 유도된 자가면역성의 억제에는 췌장 섬세포만을 포함하고, GAD 단백질을 발현하지 않는 다른 표적 조직세포에는 포함하지 않는다는 것을 나타낸다. 즉, RVV-GAD65로 NOD 마우스에 접종시켜 면역 내성을 지니게 하는 것은 β 세포 특이적 자가면역에 특이적으로

영향을 미친다는 것이다.

<67> 실험예 4: 자가반응성 T 세포에 대한 내성 유도

<68> RVV-GAD65 접종 8주 후에 NOD 마우스로부터 단일 세포의 비장세포들을 추출하였다.

그리고, 이 세포(5×10^5)를 바클로바이러스에서 생산된 GAD 단백질이 첨가된 96웰 마이크로 플레이트에서 10% 우태아 혈청, 1mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙 토마이신 및 50 mM β -메르캅토에탄올이 첨가된 완전 RPMI-1640 배지 200 μl 에서 72시간 동안 배양시켰다. 그런 다음, 이 세포를 ^3H -티미딘(thymidine; 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$)과 함께 16 ~18시간동안 배양 처리하였다. 그리고, 액체 신틸레이션 계수기(liquid scintillation counter)를 사용하여 ^3H -티미딘 결합을 측정하여 세포의 증식을 정량하였고, 그 결과를 다음 도 6에 요약하여 나타내었다.

<69> 비교 실험예 6:

<70> RVV-MJ601로 접종한 NOD 마우스를 사용한 점을 제외하고는 상기 실험예 4와 동일한 방법으로 비장세포의 증식을 정량하였고, 그 결과를 다음 도 6에 요약하여 나타내었다.

<71> 비교 실험예 7:

<72> 비접종 NOD 마우스를 사용한 점을 제외하고는 상기 실험예 4와 동일한 방법으로 비장세포의 증식을 정량하였고, 그 결과를 다음 도 6에 요약하여 나타내었다.

<73> 이상의 도 7의 결과에 따르면, 이들 비장세포는 GAD에 반응하지 않는데 반하여, GAD는 RVV-(GAD65)MJ601 접종 NOD 마우스 및 비접종 NOD 마우스에서 채취한 비장세포의 증식을 자극하였다. 또한, 3군 모두로부터 채취한 비장세포는 β 세포 단백질과 관련성이 없는 항원인 난백알부민(ovalbumin)에 대해서는 증식 반응을 나타내지 않았다. 따라

서, 이들 결과로부터 RVV-GAD65를 접종한 동물이GAD-반응성 T 세포에 대하여 내성을 나타냄을 알 수 있다.

<74> 실험예 5: GAD에 대한 체액성 면역반응 유도

<75> NOD 마우스에 RVV-GAD65를 접종 8 주후에 혈청을 채취하고, 엘리엇 등이제시한 방법(J. F. Elliot et al., Diabets 43, 1494-1499, 1994)을 이용하여 바클로바이러스에서 194-199 아미노산에 의해 생성된 GAD65 단백질과 반응시켰다. GAD65 단백질을 0.1M NaHCO₃ pH8.5 용액에 녹여 10 µg/ml이 되도록 한 후, 4℃에서 하룻밤동안 96웰 마이크로플레이트(0.1M NaHCO₃중 10 µg/ml, pH 8.5) 상에 코팅시켰다. 코팅이 끝난 마이크로플레이트를 세척 후, 결합된 항체를 알칼리 포스파타제-결합 염소 항마우스 IgG, 항 마우스 IgG1 또는 항 마우스 IgG2a 항체와 반응시켰다. 반응 후 4-니트로페닐포스페아이드와 함께 배양하여 발색시키고, ELISA reader(Mandel, Guelph, ON)로 405nm에서 흡광도(optical density)를 측정하여, GAD65 단백질의 발현량을 측정하였다. 그리고, 그 결과를 다음 도 8에 요약하여 나타내었다.

<76> 비교 실험예 8:

<77> RVV-MJ601로 접종한 NOD 마우스를 이용한 점을 제외하고는 상기 실험예 5와 동일한 방법으로 ELISA 리더(reader)를 사용하여 405nm에서 흡광도(OD)를 측정하여, GAD65 단백질의 발현량을 측정하였다. 그리고, 그 결과를 다음 도 7에 요약하여 나타내었다.

<78> 비교 실험예 9:

<79> 비접종 NOD 마우스 를 이용한 점을 제외하고는 상기 실험예 5와 동일한 방법으로 ELISA 리더(reader)를 사용하여 405nm에서 흡광도(OD)를 측정하여, GAD65 단백질의 발현

량을 측정하였다. 그리고, 그 결과를 다음 도 7에 요약하여 나타내었다.

<80> 이상의 도 8의 결과에 따르면, RVV-MJ601 접종 및 비접종 마우스와 비교할 때 RVV-GAD65 접종 마우스의 혈청에서 GAD에 대한 IgG 항체의 수준이 증가하였다. GAD에 대한 IgG 항체의 아이소타입(isotype)을 조사하였을 때, RVV-MJ601 접종 NOD 마우스에 비해, IgG1 서브타입의 수준은 RVV-GAD65 접종 NOD 마우스에서 유의성있게 증가한 반면, IgG2 서브타입은 변함이 없었다. 이러한 결과는 본 발명의 RVV-GAD65가 Th2 면역반응을 증강시켰음을 암시한다.

<81> 실험예 6: 사이토카인 생성의 확인

<82> RVV-접종 NOD 마우스의 비장 T 세포에서 사이토카인의 생성여부를 공지의 방법 (H.S. Jun et al., J. Exp. Med. 189, 347-358, 1999)에 따라 측정하였다. 즉, RVV-GAD65 접종 8주 후 비장세포를 분리한 후 이들 세포를 GAD 단백 및 난백알부민이 첨가된 24웰 플레이트(1×10^6 cells/well)의 완전 RPMI-1640 배지에서 72시간 동안 배양하였다. 상등액을 취하고 IFN- γ 및 IL-4 생성을 Quantikine 키트(R&D Systems사, Minneapolis, MN)를 사용하여 샌드위치 ELISA 방법으로 측정하였으며, 그 결과를 각각 도 8 및 도 9에 요약하여 나타내었다.

<83> 비교 실험예 10:

<84> RVV-MJ601로 접종한 NOD 마우스를 이용한 점을 제외하고는 상기 실험예 6과 동일한 방법으로 비장 T 세포에서 IFN- γ 및 IL-4 생성여부를 측정하였다. 그리고, 그 결과를 각각 도 8 및 도 9에 요약하여 나타내었다.

<85> 비교 실험예 11:

<86> 비접종 NOD 마우스를 이용한 점을 제외하고는 상기 실험예 6과 동일한 방법으로 비장 T 세포에서 IFN- γ 및 IL-4 생성여부를 측정하였다. 그리고, 그 결과를 각각 도 8 및 도 9에 요약하여 나타내었다.

<87> 이상의 결과에 따르면, IL-4 및 IFN-r의 생성은 RVV-MJ601 접종 NOD 마우스 및 비접종 NOD 마우스에서의 비장세포와 비교할 때, RVV-GAD65 접종 마우스의 비장세포에서 IL-4의 증가 및 IFN-r의 감소가 관찰되었다. 결국, 이러한 결과들로부터 NOD 마우스를 RVV-GAD65로 면역하면 항원 특이적으로 Th2 면역반응을 유도함을 알 수 있는데, 이러한 결과는 실험예 5에서 얻은 결과와 일치하는 것이다.

<88> 실험예 7: 역전사효소 폴리머라제 연속반응(RT-PCR) 분석

<89> RVV-GAD65 접종후 1, 2 및 3주째에 RNA 추출키트(Qiagen Inc.사, Mississauga, ON, Canada)를 사용하여 키트의 프로토콜에 따라 마우스의 비장세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 총 RNA의 2 μ g을 슈퍼스크립트 II 역전사효소 (Superscript II reverse transcriptase, Gibco BRL사, Gaithersburg, MD) 및 oligo-dT를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 각종 사이토카인에 특이적인 프라이머(primer)를 사용하여 공지의 방법(H.S. Jun et al., J. Exp. Med. 189, 347-358, 1999)에 따라 서열 1 - 서열 8의 시발체를 이용하여 PCR을 수행하였다.

<90> 이때, 내부표준으로서는 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase; HPRT) mRNA를 사용하여 증폭시켰으며, 사용된 시발체는 서열 9 - 서열 10과 같다

<91> 그리고, PCR 조건은 각 프라이머 세트에 맞도록 최적화했다. 증폭이 직쇄상 범위

로 발생하도록 하기 위하여 상이한 사이클 수의 PCR을 수행했다. PCR 혼합물($50\mu\text{l}$)은 0.2mM 의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(deoxynucleotide triphosphate), $1\mu\text{M}$ 의 각각의 특정 프라이머, 1.5mM 또는 2mM MgCl_2 , 50mM KCl , 10mM 트리스-염소($\text{pH}9.0$) 및 2.5 단위의 Taq 폴리머라제(Pharmacia Biotech사, Uppsala, Sweden) 등으로 구성되었다. 증폭 후, 생성물을 1.5% 아가로스 겔상에서 전기영동하고, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색에 의해 검출하였다.

<92> 실험예 8: 당뇨병의 전이(adoptive transfer)

<93> NOD 마우스를 RVV-GAD65로 면역시키는 것이 조절 면역반응(regulatory immune response)의 생성을 촉진시켜 이펙터 T 세포(effector T cell)에 의한 파괴로부터 β 세포를 보호하는지를 조사하였다. 즉, 3 주령의 암컷 NOD 마우스에 RVV-GAD65(5×10^7 PFU/mouse)를 접종하였다. 그후, 20 주령 때에 RVV-GAD65 접종 마우스로부터 비장세포(1×10^7 cells)를 분리하고, 이들 비장 임파구를 급성 당뇨병에 걸린 NOD 마우스에서 분리한 비장 임파구와 같은 수로 혼합하여 6 내지 8주령의 NOD scid 마우스에 복강접종하였다. 그리고, 당뇨병의 발병을 확인하기 위하여 격일 간격으로 뇨당 및 혈당을 측정하였으며, 그 결과를 다음 도 10에 요약하여 나타내었다.

<94> 비교 실험예 12:

<95> RVV-MJ601로 접종한 NOD 마우스를 이용한 점을 제외하고는 상기 실험예 8과 동일한 방법으로 분리한 비장 임파구를 6 내지 8주령의 NOD.scid 마우스에 복강접종한 후, 당뇨병의 발병을 확인하기 위하여 격일 간격으로 뇨당 및 혈당을 측정하였으며, 그 결과를 다음 도 10에 요약하여 나타내었다.

<96> 비교 실험예 13:

<97> 비접종 NOD 마우스를 이용한 점을 제외하고는 상기 실험예 8과 동일한 방법으로 분리한 비장 임파구를 6 내지 8주령의 NOD.scid 마우스에 복강접종한 후, 당뇨병의 진행을 확인하기 위하여 격일 간격으로 뇨당 및 혈당을 측정하였으며, 그 결과를 다음 도 10에 요약하여 나타내었다.

<98> 그 결과, RVV-GAD65 접종 NOD 마우스로부터 채취한 비장세포를 함유하는 비장 임파구를 접종시킨 NOD.scid 마우스의 33%(3/9)에서 당뇨병이 발병된 반면, RVV-MJ601 접종 NOD.scid 마우스로부터 채취한 비장세포를 함유하는 비장 임파구를 접종시킨 NOD.scid 마우스의 90%(9/10)에서 당뇨병이 발병되었다. 이들 결과는 GAD를 발현하는 백시니아 당뇨병 백신이 조절 T 세포(regulatory T cell) 개체를 유도하는 등의 세포성 면역의 기능을 변경시키거나, 항원-제시 세포(antigen-presenting cell)의 활성을 변경하거나, 또는 면역억제 사이토카인(예, IL-4, TGF β)의 방출을 촉진시키는 등의 작용을 통하여 NOD 마우스에서 당뇨병의 발현을 억제시킬 수 있음을 나타낸다.

【발명의 효과】

<99> 본 발명은 글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 제 1형 당뇨병 예방백신에 관한 것이다. 이러한 본 발명에 따르면, GAD-발현 백시니아 바이러스는 보다 경제적인 방법으로 GAD를 대량생산할 수 있을 뿐 아니라, 강력한 면역 반응을 유도하고, 심각한 부작용이 없이 사람에게 성공적으로 사용할 수 있는 백시니아 바이러스를 제작할 수 있다. 따라서, GAD-발현 백시니아 바

이러스를 포함하는 본 발명에 따른 당뇨병 예방백신은 당뇨병 진행에 대하여 높은 위험성을 갖는 개체에 있어서 제 1형 당뇨병을 예방하기 위한 백신으로서 매우 유용하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 바이러스는 백시니아 바이러스(ATCC:VR-1354)인 것을 특징으로 하는 재조합 백시니아 바이러스.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항의 재조합 백시니아 바이러스를 포함하는 제 1 형 당뇨병 예방백신.

IL-2 : 센스 - CTTGCCCAAGCAGGCCACAG,

안티센스 - GAGCCTTATGTGTTGTAAGC;

INF- γ : 센스-AGCTCTGAGACAATGAACGC,

안티센스-GGACAATCTCTTCCCCACCC;

IL-4 : 센스-TCTTTCTCGAATCTACCAGG,

안티센스-CATGGTGGCTCAGTACTACG;

IL-10 : 센스-CAAACAAAGGACCAGCTGGAC,

안티센스-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG.

센스-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC,

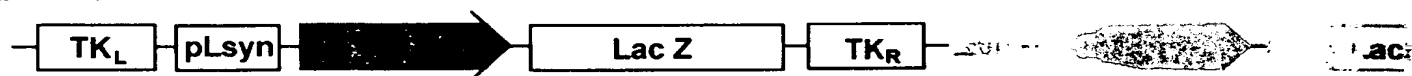
안티 센스-CAAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA.

【도면】

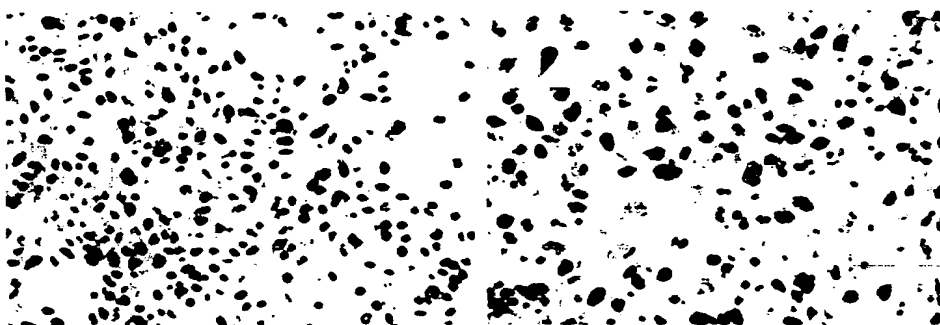
【도 1a】

(원본 추후 제출)

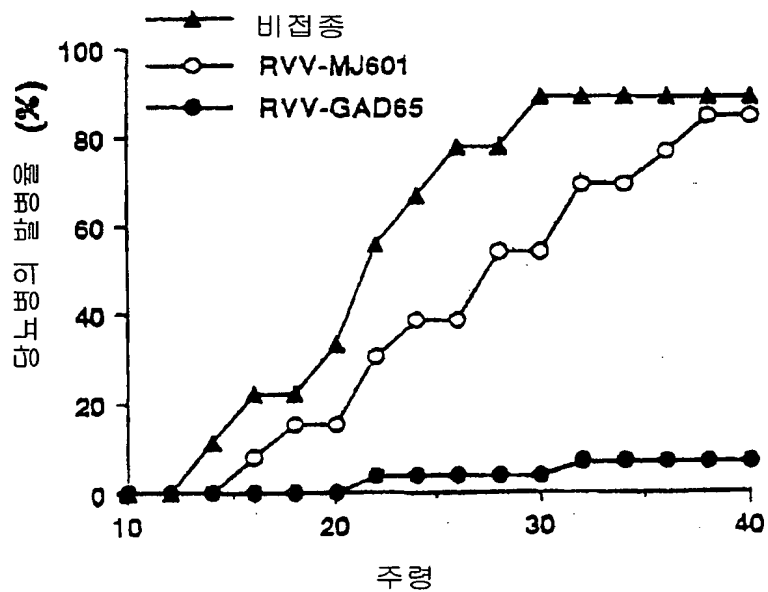
【도 1b】



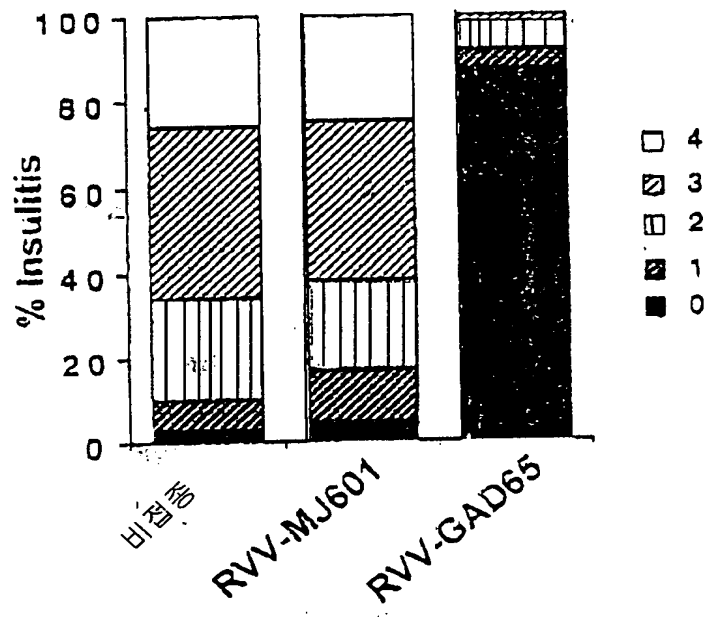
【도 2】



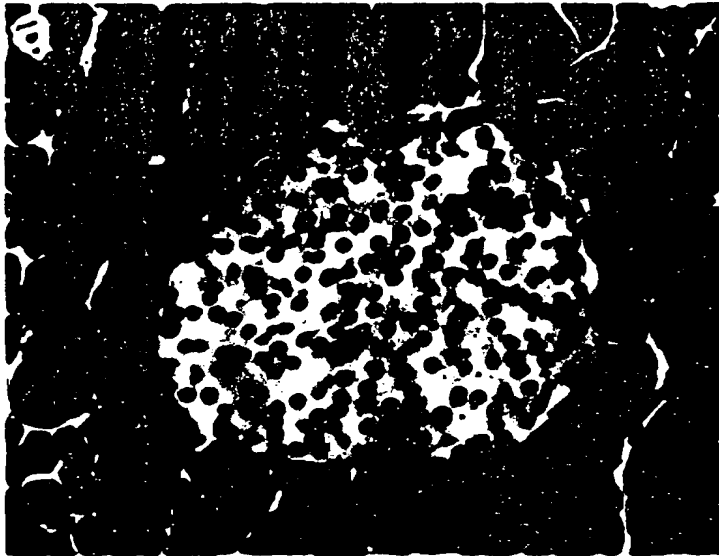
【도 3】



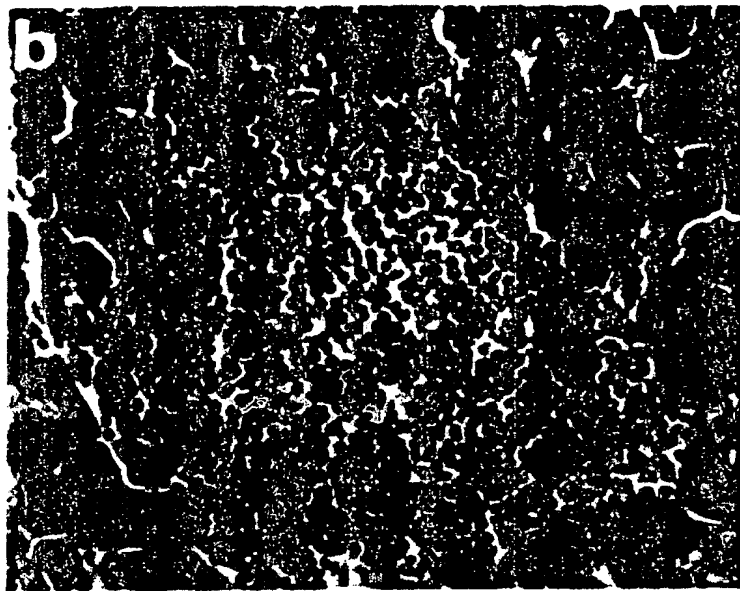
【도 4】



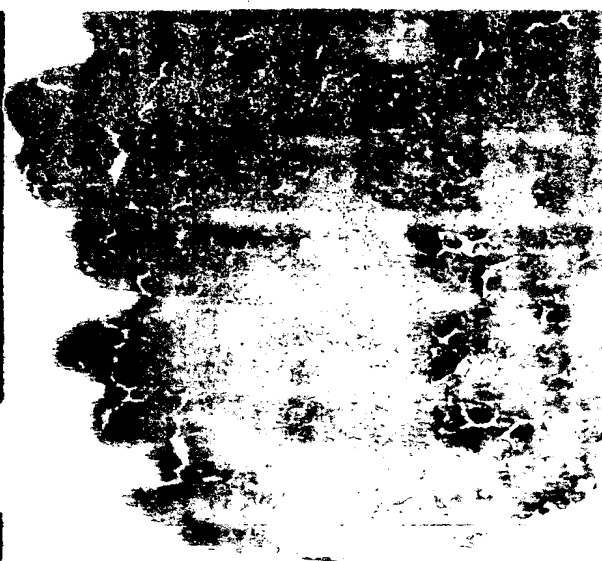
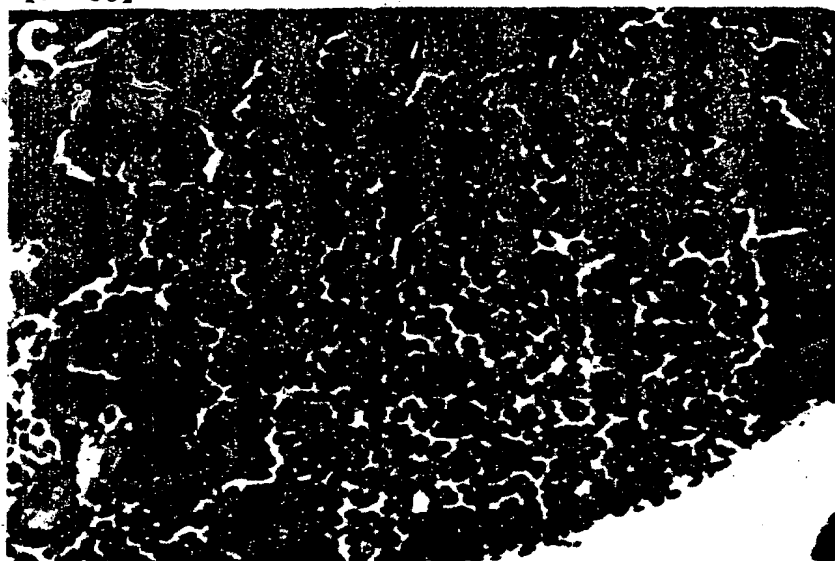
【도 5a】



【도 5b】



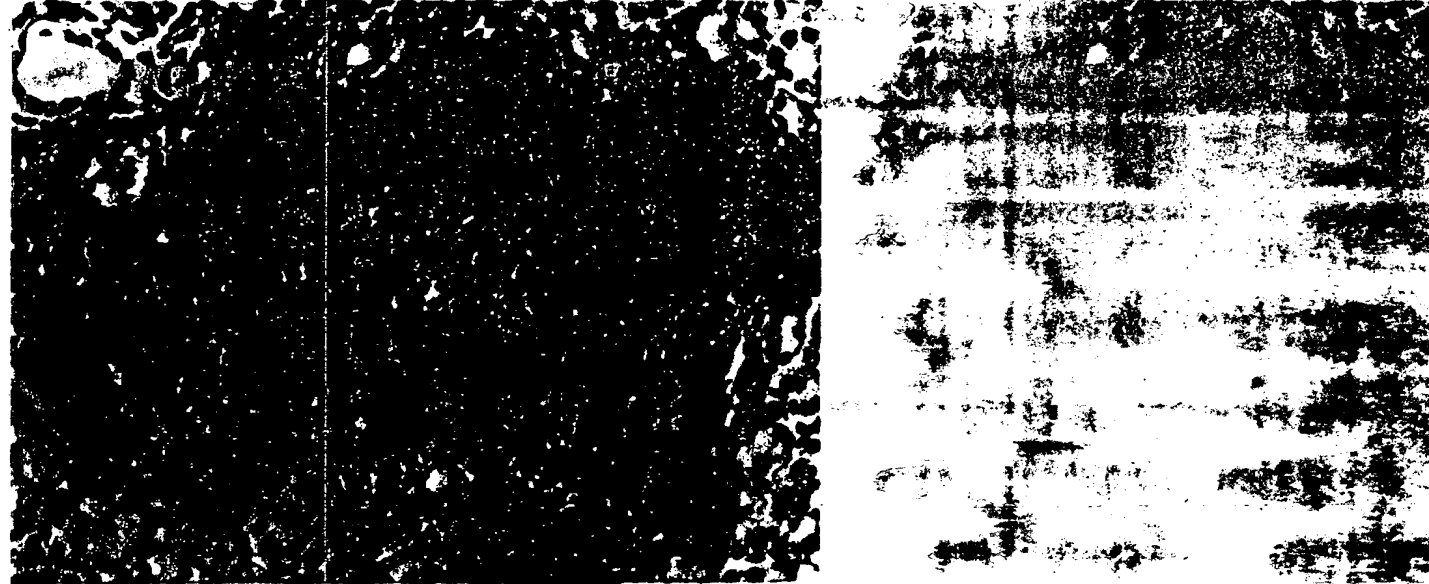
【도 5c】



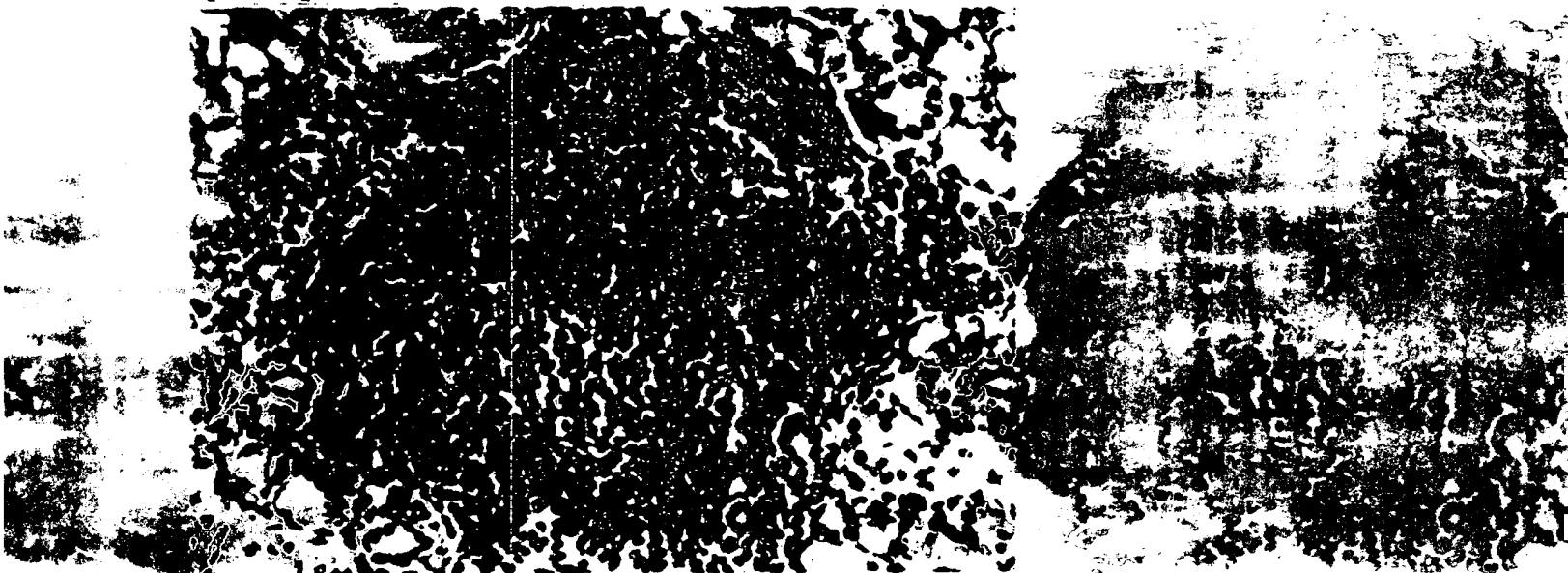
【도 5d】



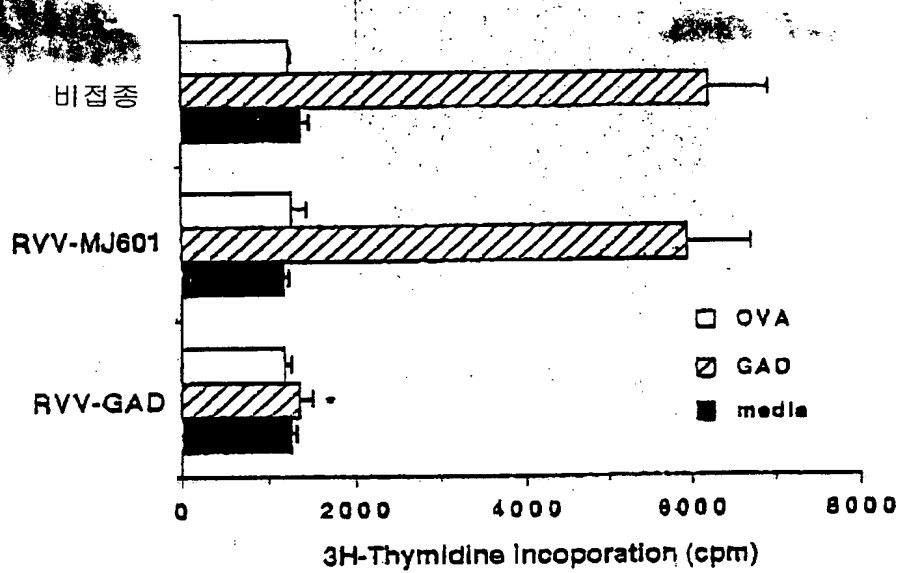
【도 5e】



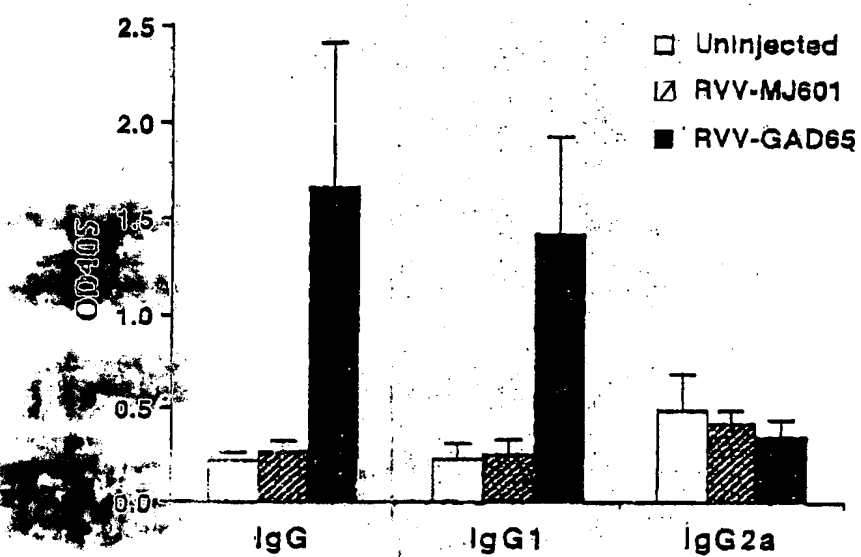
【도 5f】



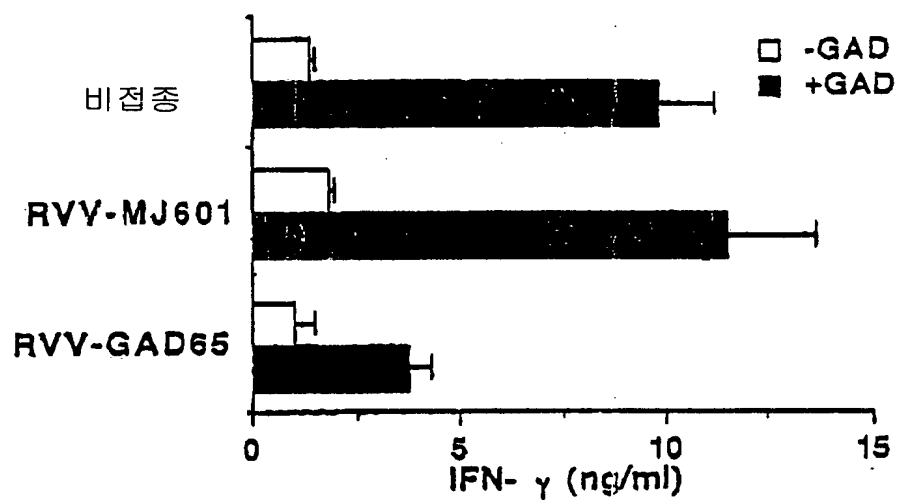
【도 6】



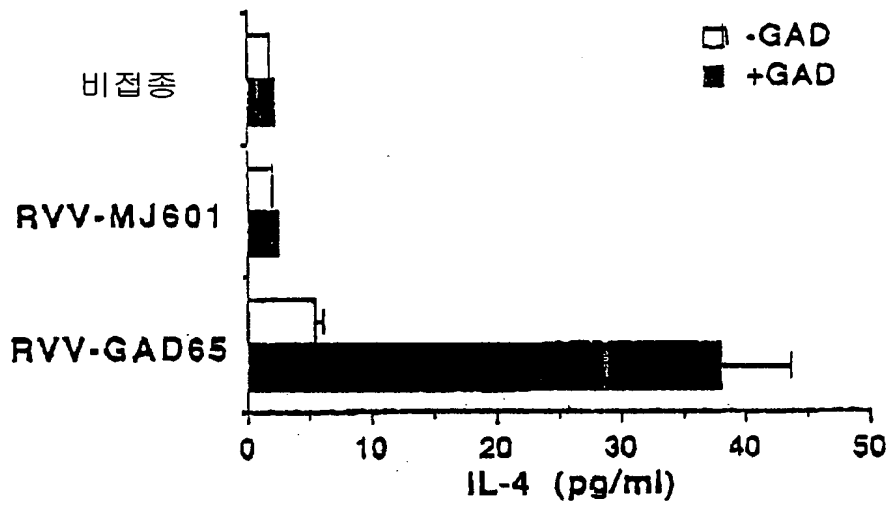
【도 7】



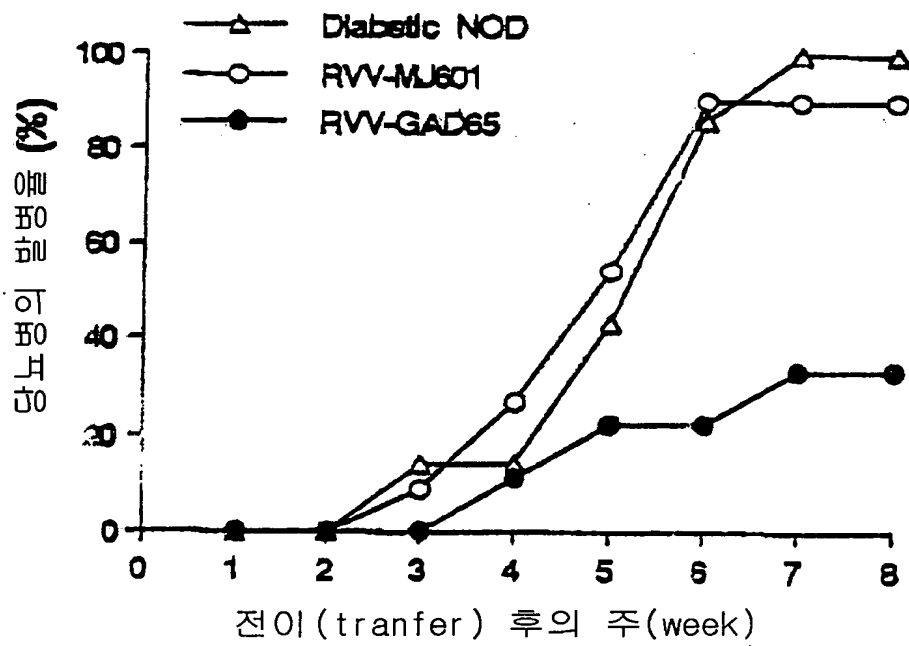
【도 8】



【도 9】



【도 10】



【서류명】 서지사항 보정서
 【수신처】 특허청장
 【제출일자】 2001.01.05

【제출인】
 【명칭】 주식회사 녹십자
 【출원인코드】 1-1998-000506-8
 【사건과의 관계】 출원인

【대리인】
 【성명】 신용길
 【대리인코드】 9-1998-000266-2
 【포괄위임등록번호】 2001-000386-7

【대리인】
 【성명】 정진수
 【대리인코드】 9-1999-000369-4
 【포괄위임등록번호】 2001-000388-1

【사건의 표시】
 【출원번호】 10-2000-0085420
 【출원일자】 2000.12.29
 【심사청구일자】 2000.12.29
 【발명의 명칭】

글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된
 재조합 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 제 1형 당뇨병
 예방 백신

【제출원인】
 【접수번호】 1-1-00-0285663-93
 【접수일자】 2000.12.29
 【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】
 【보정대상 항목】 대리인
 【보정방법】 정정
 【보정내용】

【대리인】
 【성명】 신용길
 【대리인코드】 9-1998-000266-2
 【포괄위임등록번호】 2001-000386-7

【대리인】**【성명】**

정진수

【대리인코드】

9-1999-000369-4

【포괄위임등록번호】

2001-000388-1

【취지】

특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인
신용길 (인) 대리인
정진수 (인)

【수수료】**【보정료】**

0 원

【기타 수수료】

원

【합계】

0 원

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.03.26
【제출인】	
【명칭】	주식회사 녹십자
【출원인코드】	1-1998-000506-8
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	신용길
【대리인코드】	9-1998-000266-2
【포괄위임등록번호】	2001-000386-7
【대리인】	
【성명】	정진수
【대리인코드】	9-1999-000369-4
【포괄위임등록번호】	2001-000388-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2000-0085420
【출원일자】	2000.12.29
【심사청구일자】	2000.12.29
【발명의 명칭】	글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 제 1형 당뇨병 예방 백신
【제출원인】	
【발송번호】	1-5-2001-0015661-19
【발송일자】	2001.03.26
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	수수료
【보정방법】	납부
【보정내용】	미납 수수료
【취지】	특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합 니다. 대리인 신용길 (인) 대리인 정진수 (인)

1020000085420

출력 일자: 2001/4/18

【수수료】

【보정료】	11,000	원
-------	--------	---

【기타 수수료】	0	원
----------	---	---

【합계】	11,000	원
------	--------	---

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.03.29
【제출인】	
【명칭】	주식회사 녹십자
【출원인코드】	1-1998-000506-8
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	신용길
【대리인코드】	9-1998-000266-2
【포괄위임등록번호】	2001-000386-7
【대리인】	
【성명】	정진수
【대리인코드】	9-1999-000369-4
【포괄위임등록번호】	2001-000388-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2000-0085420
【출원일자】	2000.12.29
【심사청구일자】	2000.12.29
【발명의 명칭】	글루타민산 데카르복실라제를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 제 1형 당뇨병 예방 백신
【제출원인】	
【발송번호】	1-5-2001-0016463-54
【발송일자】	2001.03.29
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	수수료
【보정방법】	납부
【보정내용】	미납 수수료
【취지】	특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합 니다. 대리인 신용길 (인) 대리인 정진수 (인)

1020000085420

출력 일자: 2001/4/18

【수수료】

【보정료】	11,000	원
-------	--------	---

【기타 수수료】	0	원
----------	---	---

【합계】	11,000	원
------	--------	---

과장